

学校编码: 10384
学 号: 24520131153469

分类号____密级____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

类风湿关节炎外周血单个核细胞的组蛋白
乙酰化研究

The role of histone acetylation in Rheumatoid arthritis
peripheral blood mononuclear cells

宋丽娜

指导教师姓名:	石桂秀
专 业 名 称:	风湿免疫学
论文提交日期:	2016 年 4 月
论文答辩日期:	2016 年 5 月

2016 年 4 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

研究背景 类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的全身性自身免疫疾病, 以慢性、进行性、侵袭性关节炎为主要临床表现。该病发病机制尚不明确, 研究其发病机制对临床指导治疗具有极其深远的意义。组蛋白乙酰化在 RA 的发病机制中具有重要作用。组蛋白乙酰化是一种可逆的动态过程, 主要由组蛋白乙酰转移酶 (histone acetylase, HATs) 和组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 协调修饰。既往研究中, Huber, L. C. 等人的研究显示, HDAC1 在 RA 滑膜组织中的表达较 OA 和健康对照组是降低的, 并且 HDACs 总体活性减低, 而后来 Tomoko Kawabata 等人的研究结果与之恰恰相反, 结果显示 HDAC1 在 RA 滑膜组织中的表达是增高的, 且 HDACs 总体活性增高。据既往研究推测, 恢复 HDACs 活性可能对 RA 的治疗有所帮助, 但也有研究指出组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, HDACi) 在治疗动物模型的关节炎和其他慢性炎症中取得了良好的成效, 以上研究结果及结论存在矛盾。再者, 组蛋白乙酰化作用在 RA 外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 中的研究相对较少, 仅有 Eric Tousssirot 等学者研究了 RA 患者 PBMCs 中 HATs 与 HDACs 的失衡等报道, 但并没有分析 PBMCs 中 HDACs 的表达情况。因此, 我们在此次课题中, 研究了 RA 外周血 PBMCs 中 HDACs 的表达, 并检测其 HDACs 总体活性, 分析 HDACs 的表达和 HDACs 总体活性与 RA 疾病活动度指标的相关性, 从而初步明确组蛋白乙酰化修饰在 RA 患者 PBMCs 中的作用, 进一步揭示 RA 的发病机制。

研究目的 明确 RA 患者 PBMCs 中 HDACs 的表达及其总体活性, 并分析 HDACs 的表达及总体活性与 RA 疾病活动度指标之间的关系, 从而进一步揭示 RA 的发病机制。

方法 分别采集年龄及性别相当的 RA 患者 34 名 (实验组) 及健康参与者 34 名 (对照组) 外周血, 分离出 PBMCs, 提取其 RNA 及总蛋白、核蛋白, 采用荧光定量 PCR (qPCR) 及免疫印迹法 (western blot) 检测实验样本 HDACs 的表达情况; 应用 HDAC Assay Kit 试剂盒检测其 HDACs 总体活性, 统计 RA 患者 ESR、CRP、

DAS28 等疾病活动度相关临床资料，并分析 HDACs 的表达及总体活性与 RA 相关疾病活动度指标之间的相关性。

结果 结果显示，RA 患者 PBMCs 中 HDAC1、HDAC2 在 mRNA 和蛋白水平上的表达较健康对照组明显减低 ($p < 0.05$)，虽随 RA 疾病活动度指标 ESR、CRP、DAS28 的增高而降低，但不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。RA 患者 PBMCs 细胞核中 HDACs 的总体活性较健康对照组明显降低 ($p = 0.0001$)，并且随 RA 疾病活动度指标 ESR、CRP 的增高而降低 ($P < 0.05$)，虽也随着 DAS28 的增高而降低，但不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

结论 HDAC1、HDAC2 mRNA 和蛋白水平上的表达及细胞核 HDACs 总体活性在 RA 患者 PBMCs 中表达明显减低，并且随 RA 疾病活动度指标的增高而降低，因此，组蛋白乙酰化修饰可能参与了 RA 的发病。

关键词 类风湿关节炎 表观遗传学 组蛋白乙酰转移酶 组蛋白去乙酰化酶 细胞核组蛋白去乙酰化酶总体活性

Abstract

Research background Rheumatoid arthritis (RA) is a common systemic autoimmune diseases. Chronic, progressive and invasive arthritis is the main clinical manifestation. The pathogenesis of RA is unclear. It has profound significance to unfold the pathogenesis of RA in order to guiding clinical treatment. Histone acetylation plays an important role in the pathogenesis of RA. Histone acetylation is a dynamic process of reversible, mainly modified by histone acetylases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). During the previous studies, Huber, L.C., et al. showed that HDAC1 in RA synovial tissue expression was reduced, and the same as the total nuclear HDACs activity. On the contrary, Tomoko Kawabata et al. in the further studies showed that HDAC1 expression and the total nuclear HDACs activity were higher in RA synovial tissue. According to the previous studies that restoring HDACs activity maybe helpful to the treatment of RA, but also some researches had pointed that HDACi had achieved good effect in the treatment of animal models of RA and other chronic inflammation. The research results and theories above all were contradictory. Moreover, there are very few of researches about histone acetylation in RA peripheral blood mononuclear cells, only Eric Toussirot et al reported the imbalance of HATs and HDACs activities in RA PBMCs, but they didn't evaluate the expression of HDACs. Therefore, we studied the HDACs mRNA and protein expression in PBMCs of RA, and detected the total nuclear HDACs activity, making analysis of correlation between HDACs expression, total nuclear HDACs activity and the RA disease activity, so as to further clarify the role of histone acetylation in RA PBMCs, in order to further unfolding the pathogenesis of RA.

Research purpose The goal of our study was to evaluate HDACs mRNA and protein expression in PBMCs of RA, and detected the total nuclear HDACs activity, making analysis of correlation between HDACs expression, total nuclear HDACs activity and the RA disease activity, so as to further unfold the pathogenesis of RA.

Methods Collected peripheral blood from 34 patients with RA (experimental group) and 34 healthy participants (control group) whose age and gender were matched, and then the PBMCs were isolated. Extracted the RNA, total protein, nucleoprotein. Evaluated HDACs mRNA and protein expression by fluorescence quantitative PCR (qPCR) and western blot, respectively. Detected the total nuclear HDAC activity by HDAC Assay Kit. Collected the participants' clinical material of RA disease activity such as ESR, CRP, DAS28, and making analysis of correlation between HDACs expression, total nuclear HDACs activity and the RA disease activity.

Results The results showed that the mRNA and protein expression of HDAC1, HDAC2 in RA PBMCs had significantly reduced compared with healthy controls ($p < 0.05$), and it had negative correlation with RA disease activity, but not significant ($P > 0.05$). Total nuclear HDACs activity in RA had significantly reduced compared with healthy controls ($P = 0.0001$), and it had negative correlation with ESR and CRP ($P < 0.05$), but not significantly with DAS28 ($P > 0.05$).

Conclusion HDAC1, HDAC2 mRNA and protein expression and the total nuclear HDACs activity has significantly reduced in RA PBMCs, and it has negative correlation with RA disease activity. Therefore, histone acetylation may be involved in the pathogenesis of RA.

Keywords Rheumatoid arthritis; Epigenetics; histone acetylases; histone deacetylases; total nuclear histone acetylases activity

英文缩略词表（按字母顺序）

缩略语	英文名称	中文名称
RA	Rheumatoid Arthritis	类风湿关节炎
mRNA	messenger RNA	信使 RNA
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
Tris	Trihydroxymethylaminomethane	三羟甲基氨基甲烷
g	Gram	克
ml	Milliliter	毫升
EP	Eppendorf	微量离心管
ul	Microliter	微升
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	二乙基焦碳酸盐
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
OD	Optical density	光密度
SDS	Sodium dodecylsulfate	十二烷基磺酸钠
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链反应
PBS	buffered saline	磷酸盐缓冲液
rpm	Round per minute	每分钟转速
min	Minute	分钟
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells	外周血单个核细胞
DMARDs	disease modifying antirheumatic drugs	缓解病情的抗类风湿药物
ACR	American College of Rheumatology	美国风湿病学会
DAS28	Disease Activity Score uses 28 joint counts	28 个关节疾病活动性评分
CRP	C-reactive protein	C 反应蛋白
ESR	erythrocyte sedimentation rate	血沉
RF	rheumatoid factor	类风湿因子
anti-CCP	anti-cyclic citrullinated peptides	抗环瓜氨酸肽抗体

	antibody	
ACPA	anti-citrullinated protein antibody	抗瓜氨酸化蛋白抗体
HDACi	histone deacetylase inhibitors	组蛋白去乙酰化酶抑制剂
HAT	histone acetylase	组蛋白乙酰转移酶
HDAC	histone deacetylases	组蛋白去乙酰化酶
TNF- α	tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素-6
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
pH	Potential of hydrogen	酸碱度

目 录

中文摘要·····	I
英文摘要·····	III
英文缩略词表·····	V
第一章 前言·····	1
第二章 RA 患者 PBMCs 中 HDACs 在 mRNA 水平上的表达及与 RA 疾病活动度指标之间的相关性·····	6
2.1 入组标准·····	6
2.2 入组样本临床资料·····	8
2.3 仪器与试剂·····	9
2.4 需配制的试剂·····	10
2.5 实验方法·····	10
2.6 数据及统计学分析·····	14
2.7 实验结果·····	14
第三章 HDAC1、HDAC2 在 RA 患者及健康对照者 PBMCs 中蛋白水平上的表达·····	16
3.1 仪器与试剂·····	16
3.2 实验方法·····	19
3.3 数据及统计学分析·····	21
3.4 实验结果·····	21
第四章 RA 患者 PBMCs 中 HDACs 总体活性的测定及与 RA 疾病活动度指标之间相关性的分析·····	24
4.1 实验对象及相关临床特征·····	24
4.2 仪器与试剂·····	25

4.3 实验方法	26
4.4 数据及统计学分析.....	29
4.5 实验结果.....	30
结论.....	32
讨论.....	33
总结.....	37
参考文献.....	38
致 谢.....	45
硕士期间完成的文章.....	47

Table of Contents

Chinese abstract.....	I
Englishi abstract.....	III
Abbreviation index.....	V
Chapter1 Introduction.....	1
Chapter2 HDACs mRNA expression in RA and normal control group PBMCs and the correlation with RA disease activity	6
2.1The sdandard of participants.....	6
2.2 The clinical materials of participants.....	8
2.3 Instruments and reagents.....	9
2.4 Preparation of reagents.....	10
2.5 Methods	10
2.6 Data and statistical analysis.....	14
2.7 Results.....	14
Chapter3 HDAC1,HDAC2 protein expression in RA and normal control group	18
3.1 Instruments and reagents.....	18
3.2 Methods	20
3.3 Data and statistical analysis.....	22
3.4 Results	22
Chapter4 The detection of nuclear total HDACs activity in RA and the correlation with RA disease activity.....	24
4.1The experimental subjects and the clinical materials.....	24

4.2 Instruments and reagents.....	25
4.3 Methods	26
4.4 Data and statistical analysis.....	29
4.5 Results	30
Results	32
Discussion.....	33
Conclusion.....	37
References.....	38
Acknowledgement.....	45
Completed articles during the period of master.....	47

第一章 前言

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis, RA）是一种常见的系统性的自身免疫性疾病^[1]，可累及全身多个关节及关节周围软组织，造成关节及周围软组织肿胀、非特异性炎症，进而发展为骨质破坏、畸形、功能障碍，从而使患者失去行动能力，影响生活质量^[2]。近年来，该疾病的患病率不断提升，且患病者女性是男性的3倍以上，已发展为使我国劳动者丧失劳动能力的主要疾病之一^[3, 4]。该疾病目前主要通过药物治疗，非甾体抗炎药物、糖皮质激素、免疫抑制剂、生物制剂等药物虽可以改善病情^[5]，但由于RA是终身性疾病，患者长期罹病和不间断诊治，不仅要承受药物给其带来的副作用^[6]，而且还有可能增加肿瘤、感染等疾病的患病几率^[7, 8]，经济负担和精神折磨使患者不堪重负，并且可因自行停药而导致病情反复，致使生活质量严重下降。

RA的发病机制至今尚不明确^[9]，病因可涉及到感染、内分泌系统紊乱、遗传因素等，寒冷、潮湿等外界环境及饮食生活习惯、社会心理因素也被认为是导致该病发病的原因^[10]。RA的诊断目前主要是依赖临床表现、实验室检查及影像学检查^[11, 12]。RA的特征之一是血清中可存在多种自身抗体^[13]，并且有些抗体往往出现在临床表现之前^[14]。近年来大量临床研究表明，RA相关的自身抗体的测定有助于本病的早期临床诊断^[15]。实验室检查中，以抗环瓜氨酸多肽（CCP anti-Cyclic Citrullinated Peptide, anti-CCP）抗体、抗角蛋白抗体（Anti-Keratin antibody, AKA）、抗核周因子（Anti-perinuclear factor, APF）、类风湿因子（rheumatoid factor, RF），以及血沉（erythrocyte sedimentation rate, ESR）和C反应蛋白（C-Reactive Protein, CRP）等检测为主^[16]。其中以抗CCP抗体特异性及敏感性较高，在发病前一年半的时间里，阳性检出率可达52%^[17]。但研究发现，仍有一部分RA患者抗-CCP抗体和（或）RF为阴性^[18]。因此，探究RA早期诊断实验室检查指标，并及时给予临床干预，是RA诊断及治疗的重点和热点^[19]。

有关双生子的研究表明，RA有明显的遗传倾向。在同卵双生子中发病的一致率为12 - 15%，在异卵双生子中发病的一致率为4%二卵双生^[20]。最初

发现与 RA 患病相关的基因位点位于 HLA(人类白细胞抗原)区域,其中最大的风险来自等位基因的 HLA-DRB1^[21, 22]。最近的全基因组研究已经进一步发现了 RA 的 14 个新易感性位点,可涉及到免疫和炎症反应应答^[23, 24]。导致 40 多个 RA 可疑易感基因的挖掘被提上日程。

最近,表观遗传学在 RA 中的作用提供了一个从不同角度认识疾病的新的观点,可能引发新一波的革命性的发现^[25]。表观遗传学是研究 DNA 编码序列以外的遗传物质的信息。以基因组为基础的表观遗传现象包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和小非编码 RNA(主要是 microRNA)。宽松的“非基因组基础的”表观遗传学概念最近被提出可将遗传信息编码入蛋白质^[26]。因此随着时间的延长,对表观遗传学的认识使我们对遗传物质的分子基础的有了更进一步的了解。

表观遗传学从理论上来说可以影响 RA 的各个方面,然而,大多数研究都指向三个重要领域的影响^[27, 28]。首先,表观遗传学机制可能是导致疾病的病因。举例来说,他们可能会解释环境因素的影响可以出现在疾病发病的很多年前——甚至在他们是婴儿时期或者甚至是他们的祖父母们的时期——会增加或减少携带一个可能诱发基因变异的风险因素。可遗传的表观遗传现象理论上可以增加家族内成员患病的风险,不论是否携带有诱发基因突变的因素^[29]。第二,表观遗传修饰明显有参与类风湿关节炎的发生机制。例如,从 RA 患者关节内分离出的成纤维细胞样的滑膜细胞有肿瘤样细胞的侵略性的行为^[30]。这种表型可能与 RA 患者关节损伤有关。DNA 甲基化修饰和 microRNA 的表达也可能与这种具有侵蚀性的滑膜细胞的形成有关^[31, 32]。第三,在一些组织中,表观遗传学变化可成为疾病活动和发展的生物标志物。Grabiec 等最近提出了一个模型,表观遗传修饰随着时间的推移,可造成生理学方面的“量变”,从而可以导致向临床关节炎方面转变的不同的风险^[33]。

组蛋白可以进行各种修饰包括甲基化、乙酰化、磷酸化、SUMO 化修饰、瓜氨酸化修饰等等。在 RA 中,大多数研究都集中于组蛋白乙酰化修饰作用,这是由组蛋白乙酰转移酶(histone acetylases, HATs)所介导的^[34]。HATs 主要有三类,主要是将乙酰基从乙酰辅酶 A 转移到组蛋白的赖氨酸残基上。这种乙酰化作用可以被组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)逆转。

HDACs 主要包括四类：一类包括 HDAC1-3、8，二类包括 HDAC 4、7、9、10, 第三类包括七个酶并属于 sirtuins 蛋白家族 (SIRT1-7); 第四类包括 HDAC11^[35]。HATs 和 HDACs 也可以参与非组蛋白的蛋白质的修饰, 例如 p53 肿瘤抑制蛋白可逆的乙酰化作用, 是调控细胞因 DNA 损伤介导细胞凋亡的关键因素^[36, 37]。

越来越多的研究表明, HDACs 的异常表达在介导炎症反应的过程中起到调控作用。慢性阻塞性肺疾病的患者外周肺组织内 HDACs 活性较不吸烟者明显降低, 并且 HDACs 的活性在疾病早期与晚期相比也是不同的。通过支气管镜活检检查发现, 哮喘患者的肺泡巨噬细胞的 HDACs 活性与健康对照组相比也是降低的^[38, 39]。HDAC 抑制剂已在过敏性哮喘鼠模型中被证实具有减弱炎症反应的作用^[40]。很明显, HDACs 已经是调节炎症应答及介导治疗的新靶点。

起初 HDACs 在 RA 中的研究结果是矛盾的。RA 的滑膜组织与骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 或健康对照组织相比, 由于 HDACs 活性降低, HDACs 表达减低, 尤其是 HDAC1、HDAC2, 呈现出高度乙酰化的状态^[41]。从这些研究的证据表明, 抑制 HDACs 可能不对病人有利。相反, 在滑膜组织另一个研究调查表明, RA 滑膜组织细胞的 HDAC1 表达相较 OA 和健康对照者是增高的^[42]。这项研究还发现, 滑膜组织 HDACs 活性及表达可随 TNF- α 诱导而增加。这些发现可以解释两者的区别, 前者研究样本中包括有病人进行抗-TNF 的治疗, 这可能使 HDAC 的水平降低^[43]。此外, 有学者将 RA 晚期的患者与活动期的患者相比较, 晚期 RA 组织已经被证明可以减少细胞因子的产生, 例如 IL-6, 并降低细胞浸润, 这可能影响 HDACs 的表达。有研究表明, 各 HDACs 在 RA 滑膜组织细胞与 OA 和健康对照者中表达有显著不同^[44], 如 HDAC1 表达增高, HDAC4 表达降低等。通过 siRNA (small interfering RNA, 小干扰 RNA) 转染进行 HDAC1、HDAC2 基因敲除研究显示, HDACs 可以增强细胞增殖, 减少细胞凋亡^[45]。这些研究可以表明, 抑制 HDACs 对于疾病的治疗是很重要的。如前所述, 在某种程度上, TNF 诱导使滑膜组织某些表达异常的 HDACs 表达增加是可行的。肿瘤坏死因子抑制剂的治疗可能是一种治疗 HDACs 异常表达疾病的新手段。与 HDACs 相比, 核提取物中 HATs 的

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.